

网络出版时间:2014-03-26 17:09

DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2014.04.021

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13207/j.cnki.jnwafu.2014.04.021.html>

燕山地区 7 种板栗外生菌根真菌培养条件的优化

柴迪迪, 郭素娟, 孙小兵, 秦天天

(北京林业大学 省部共建教育部森林培育与保护重点开放实验室, 北京 100083)

[摘 要] 【目的】明确 7 种板栗外生菌根真菌的最适培养条件, 为板栗菌根真菌侵染机理研究以及菌根真菌的实际生产应用奠定基础。【方法】采用固体培养, 用十字交叉法测量菌落直径, 研究不同温度(15, 20, 25, 30, 35 ℃)、pH 值(4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0)、碳源(葡萄糖、可溶性淀粉、蔗糖、麦芽糖、甘露醇)、氮源(蛋白胨、KNO₃、(NH₄)₂HPO₃、酵母浸出液)对 7 种板栗外生菌根真菌生长的影响。【结果】7 种板栗外生菌根真菌的最适生长条件存在差异, 大红菇(*Russula alutacea* (Pers.) Fr.)、黄丝膜菌(*Cortinarius turmalis* Fr.)、淡紫红菇(*Russula lilacea* (Quél.))和空柄小牛肝菌(*Boletinus cavipes* (Opat.) Kalchbr.)属中温菌, 最适生长温度均为 25 ℃, 而褪色红菇(*Russula decolorans* (Fr.) Fr.)、多根硬皮马勃(*Scleroderma polyrhizum* (J. F. Gmel.) Pers.)和华丽牛肝菌(*Boletus magnificus* W. F. Chiu) 最适生长温度均为 30 ℃, 属耐高温菌。7 种菌在 pH 为 5~6 时长势良好, 最适环境为偏酸性。大红菇、褪色红菇、黄丝膜菌和多根硬皮马勃最适碳源分别为可溶性淀粉、蔗糖、甘露醇和麦芽糖, 其他 3 种菌最适碳源均为葡萄糖。多数菌根真菌在以有机氮和铵态氮为氮源条件下的长势好于硝态氮。【结论】初步确定了 7 种板栗外生菌根真菌的最佳培养条件。

[关键词] 燕山地区; 板栗; 外生菌根真菌; 培养条件

[中图分类号] S664.201

[文献标志码] A

[文章编号] 1671-9387(2014)04-0109-08

Optimization of culture conditions for 7 chestnut ectomycorrhizal fungi in Yanshan Area

CHAI Di-di, GUO Su-juan, SUN Xiao-bing, QIN Tian-tian

(Key Lab for Silviculture and Conservation of MOE, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China)

Abstract: 【Objective】The objective of this research was to find the optimum culture conditions for 7 ectomycorrhizal fungi to improve fungi mechanism study and application. 【Method】Ectomycorrhizal fungi were cultured in solid medium and the colony diameter was measured using cross the crossover method. Then, the effect of different temperatures (15, 20, 25, 30, and 35 ℃), pH values (4.0, 5.0, 6.0, 7.0, and 8.0), carbon sources (dextrose, soluble starch, saccharose, maltose, and mannitol) and nitrogen sources (peptone, KNO₃, (NH₄)₂HPO₃, and yeast extract) were researched. 【Result】Large differences were found in the optimum conditions of the 7 ectomycorrhizal fungi. *Russula alutacea* (Pers.) Fr., *Cortinarius turmalis* Fr., *Russula lilacea* Quél., and *Boletinus cavipes* (Opat.) Kalchbr. belonged to moderate temperature fungi with the optimum temperature of 25 ℃, while the optimum temperature of *Russula decolorans* (Fr.) Fr., *Scleroderma polyrhizum* (J. F. Gmel.) Pers., and *Boletus magnificus* W. F. Chiu was 30 ℃. The op-

[收稿日期] 2013-04-07

[基金项目] 国家林业公益性行业科研专项重大项目“板栗产业链环境友好丰产关键技术研究与示范”(201204401); “十二五”农村领域国家计划专题“北方板栗高效生产关键技术研究与示范”(2013BAD14B0402)

[作者简介] 柴迪迪(1985—), 男, 黑龙江安达人, 在读博士, 主要从事外生菌根真菌研究。E-mail: 040108311@163.com

[通信作者] 郭素娟(1965—), 女, 内蒙古呼和浩特人, 教授, 主要从事经济林栽培和利用理论与技术研究。

E-mail: gwangzs@263.net

timum pH values of all ectomycorrhizal fungi were 5.0—6.0. The optimum carbon sources of *Russula decolorans* (Fr.) Fr., *Cortinarius turmalis* Fr., *Scleroderma polyrhizum* (J. F. Gmel.) Pers., and *Russula alutacea* (Pers.) Fr were saccharose, mannitol, maltose and soluble starch, respectively, while the optimum carbon sources of all others were dextrose. Most ectomycorrhizal fungi growing in the medium with organic nitrogen or ammonium nitrogen were better than nitrate nitrogen. 【Conclusion】 The optimal cultivating conditions for the 7 chestnut ectomycorrhizal fungi were preliminarily determined.

Key words: Yanshan Area; chestnut; ectomycorrhizal fungi; condition of culture

板栗 (*Castanea mollissima* Bl.) 属于壳斗科 (Fagaceae) 栗属 (*Castanea* Miller) 植物, 在我国北方分布在山东、北京、天津、河北和河南北部等地, 在太行山及燕山山脉的片麻岩地区分布较为集中^[1]。板栗的各种优良抗性都与它的外生菌根真菌密不可分^[2], 国际上对板栗菌根真菌的研究较为普遍和深入, 例如 Pereira 等^[3]研究了欧洲板栗外生菌根真菌与腐生菌的关系, 指出腐生菌的出现时间对菌根真菌侵染效果有显著的影响。Martins 等^[4]研究表明, 板栗园内栽培多种可食用的菌根真菌, 结合不同耕作方式, 可提高板栗园收益和恢复果园的生物多样性。Vizzini 等^[5]利用分子手段鉴定出与壳斗科 (Fagaceae) 植物共生的外生菌根真菌新种, 该种属于肉齿菌属 (*Sarcodon*)。Palmer 等^[6]研究了美国板栗菌根真菌种群的组成, 并鉴定出 46 种外生菌根真菌。我国关于板栗菌根真菌的研究相对较少, 秦岭等^[2]初步调查发现, 燕山地区能与板栗形成外生菌根的真菌有 13 属 29 种。此外, 秦岭等^[7]还发现, 板栗菌根真菌的分布受温度、湿度、土壤、树龄等多因素的影响。但在此之后, 由于菌根的共生体系较为复杂^[8], 其共生结构涉及的代谢产物、根系分泌物和菌根分泌物难以分辨, 加之自然环境的影响, 增大了研究的难度, 致使对于板栗菌根真菌的侵染机理和资源开发研究一直没有较大的进展。对外生菌根真菌的纯培养, 克服了外界环境因素的干扰, 可以在实验室条件下控制各种环境因子, 有利于对菌根真菌开展更为深入的研究^[9]。

笔者通过调查、采样、分离、纯化得到燕山地区 7 种板栗菌根真菌, 分别为: 大红菇 (*Russula alutacea* (Pers.) Fr)、褪色红菇 (*Russula decolorans* (Fr.) Fr.)、黄丝膜菌 (*Cortinarius turmalis* Fr.)、多根硬皮马勃 (*Scleroderma polyrhizum* (J. F. Gmel.) Pers.)、空柄小牛肝菌 (*Boletinus cavipes* (Opat.) Kalchbr.)、淡紫红菇 (*Russula lilacea* Quél.) 和华丽牛肝菌 (*Boletus magnificus* W. F. Chiu)。本试验通过研究不同环境因素对 7 种板栗

外生菌根真菌生长状况的影响, 探索 7 种外生菌根真菌各自的最佳培养条件, 旨在为促进板栗菌根真菌侵染机理的研究以及菌根真菌的生产应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材 料

1.1.1 供试外生菌根真菌的采集 2011 年和 2012 年的 6—10 月份, 在燕山地区不同地点的板栗林下采集真菌子实体, 采集时将子实体基部的土壤或腐殖质轻轻挖开, 在菌丝层中找到菌丝束或菌索, 直到确认与板栗根系相连后采集子实体, 共采集到 25 种外生菌根真菌的子实体 (通过子实体形态学特征和解剖学特征将其鉴定到种)。经过人工分离、纯化后, 得到 7 种板栗外生菌根真菌菌丝 (表 1)。

表 1 供试的板栗外生菌根真菌
Table 1 Ectomycorrhizal fungi tested in the study

供试菌种名称 Name	来源 Source
大红菇 <i>Russula alutacea</i> (Pers.) Fr	子实体分离 Sporocarp
褪色红菇 <i>Russula decolorans</i> (Fr.) Fr.	子实体分离 Sporocarp
黄丝膜菌 <i>Cortinarius turmalis</i> Fr.	子实体分离 Sporocarp
多根硬皮马勃 <i>Scleroderma polyrhizum</i> (J. F. Gmel.) Pers.	子实体分离 Sporocarp
空柄小牛肝菌 <i>Boletinus cavipes</i> (Opat.) Kalchbr.	子实体分离 Sporocarp
淡紫红菇 <i>Russula lilacea</i> Quél.	子实体分离 Sporocarp
华丽牛肝菌 <i>Boletus magnificus</i> W. F. Chiu	子实体分离 Sporocarp

1.1.2 试验培养基 本研究以 MMN (Modified Melin-Norkans) 为基础培养基^[10], 并在不同的环境因素试验中替换 MMN 的部分组成成分。

1.2 方 法

1.2.1 菌根真菌的形态学特性研究 试验使用 MMN 培养基, 将 7 种纯化的外生菌根真菌在固体平板培养基上活化后, 用内径为 0.65 cm 的打孔器取等量且长势相同的 7 种菌根真菌, 分别接种于平板培养基中心, 置于 25 ℃ 恒温培养箱中倒扣培养,

每隔 1 d 对其生长情况作 1 次检查,记录菌丝萌动时间、菌落形态和菌落生长速度。

1.2.2 菌根真菌的生理学特性研究 (1)温度对菌根真菌生长的影响。将 7 种纯化的外生菌根真菌在固体平板培养基上活化后,用灭过菌、内径为 0.65 cm 的打孔器,打取长势一致的菌饼,接种在盛有 MMN 培养基的直径 90 mm 培养皿中(MMN 培养基添加量为 20 mL),分别置于 15,20,25,30 和 35 ℃ 恒温条件下倒扣培养,不同温度处理 3 次重复,用十字交叉法在接种后 7 d 对菌落直径进行测量。

(2)pH 值对菌根真菌生长的影响。研究采用 DELTA 320pH 计测定 pH 值,用 0.1 mol/L HCl 和 0.1 mol/L NaOH 标准液精确调整 MMN 培养基的 pH 值,调整后培养基 pH 分别为 4.0,5.0,6.0,7.0,8.0。灭菌后对 pH 值再次测定,根据 7 种菌根真菌温度的试验结果,在各自最适的温度下分别培养,接种方法同(1),不同 pH 处理 3 次重复,用十字交叉法在接种后 7 d 对菌落直径进行测量。

(3)碳源对菌根真菌生长的影响。基础培养基为 MMN,将其中的葡萄糖分别换成甘露醇、蔗糖、麦芽糖和可溶性淀粉,各碳源中的碳含量同 20 g/L 葡萄糖,用不加任何糖类物质的培养基作对照,根据 7 种菌根真菌温度的试验结果,在各自最适的温度下分别培养,接种方法同(1),不同碳源处理 3 次重

复,用十字交叉法在接种后 7 d 对菌落直径进行测量。

(4)氮源对菌根真菌生长的影响。基础培养基为 MMN,分别用 3 g/L 蛋白胨、3 g/L 酵母浸出液和 0.25 g/L KNO₃ 代替原 MMN 中的(NH₄)₂HPO₃ 和麦芽汁。用不加任何氮源物质的培养基作对照,根据 7 种菌根真菌温度的试验结果,在各自最适的温度下分别培养,接种方法同(1),不同氮源处理 3 次重复,用十字交叉法在接种后 7 d 对菌落直径进行测量。

1.3 数据处理与分析

使用 SPSS 软件对试验数据进行方差分析处理。

2 结果与分析

2.1 7 种板栗外生菌根真菌的培养特性

由表 2 可知,将 7 种外生菌根真菌置于 MMN 培养基内培养,在培养过程中大部分菌种较易培养。多根硬皮马勃、空柄小牛肝菌和淡紫红菇菌落絮状、疏松,菌丝气生,生长速度快;大红菇、褐色红菇、黄丝膜菌和华丽牛肝菌菌落绒状,靠近培养基的菌丝紧密,远离培养基的菌丝疏松,菌丝半气生。培养大红菇时,培养基颜色变为淡紫色;培养空柄小牛肝菌时,培养基颜色变为褐色。

表 2 7 种板栗外生菌根真菌的培养性状
Table 2 Culturing characteristics of the 7 chestnut ectomycorrhiza fungi

菌根真菌 Ectomycorrhiza	菌丝体生长习性 Growth behavior of ectomycorrhizal fungi	培养基颜色变化 Color changes in the culture medium	生长速度/ (mm·d ⁻¹) Daily growing rate
大红菇 <i>Russula alutacea</i> (Pers.) Fr	半气生 Hemiaerophyte	变为淡紫色 Lavender	0.249
褪色红菇 <i>Russula decolorans</i> (Fr.) Fr.	半气生 Hemiaerophyte	无变化 No change in color	0.631
黄丝膜菌 <i>Cortinarius turmalis</i> Fr.	半气生 Hemiaerophyte	无变化 No change in color	0.547
多根硬皮马勃 <i>Scleroderma polyrhizum</i> (J. F. Gmel.) Pers.	气生 Atmogenic	无变化 No change in color	1.213
空柄小牛肝菌 <i>Boletinus caviipes</i> (Opat.) Kalchbr.	气生 Atmogenic	变为褐色 Brown	0.753
淡紫红菇 <i>Russula lilacea</i> Quél.	气生 Atmogenic	无变化 No change in color	1.047
华丽牛肝菌 <i>Boletus magnificus</i> W. F. Chiu	半气生 Hemiaerophyte	无变化 No change in color	0.557

2.2 培养条件对 7 种板栗外生菌根真菌生理学特性的影响

2.2.1 温度 采用单因素方差分析的方法,分析同一种外生菌根真菌在不同温度条件下的菌落直径,结果(表 3)显示,温度对所有菌根真菌的生长都有极显著($P<0.01$)影响。

温度对 7 种板栗外生菌根真菌生长状况的影响结果见图 1。图 1 显示,所有板栗外生菌根真菌的菌落直径都随着温度的升高呈现出先增长,达最大

值后迅速降低的趋势。其中褪色红菇、华丽牛肝菌和多根硬皮马勃在 30 ℃ 条件下菌落直径最大,表明它们的最适生长温度为 30 ℃;当温度为 35 ℃ 时,它们的菌落直径依然较大,说明 3 种真菌为耐高温型真菌。大红菇、黄丝膜菌、淡紫红菇和空柄小牛肝菌是典型的中温型菌根真菌,最适生长温度都为 25 ℃,但是淡紫红菇、空柄小牛肝菌和黄丝膜菌在 25 ℃ 时生长速度非常迅速,而大红菇生长速度相对缓慢。

表 3 温度对 7 种板栗外生菌根真菌生长影响的单因素方差分析

Table 3 One-way ANOVA for effects of different temperatures on culturing of ectomycorrhizal fungi

菌根真菌 Ectomycorrhiza	df	离均差平方和 ANOVA SS	均方 Mean square	F 检验值 F value	Pr>F
大红菇 <i>Russula alutacea</i> (Pers.)Fr	4	5.677	1.417	42.337	<0.000 1
褪色红菇 <i>Russula decolorans</i> (Fr.) Fr.	4	68.777	17.194	152.358	<0.000 1
黄丝膜菌 <i>Cortinarius turmalis</i> Fr.	4	43.632	10.908	393.935	<0.000 1
多根硬皮马勃 <i>Scleroderma polyrhizum</i> (J. F. Gmel.) Pers.	4	45.329	11.332	103.675	<0.000 1
空柄小牛肝菌 <i>Boletinus cavipes</i> (Opat.) Kalchbr.	4	28.633	7.158	77.190	<0.000 1
淡紫红菇 <i>Russula lilacea</i> Quél.	4	18.308	4.577	62.544	<0.000 1
华丽牛肝菌 <i>Boletus magnificus</i> W. F. Chiu	4	33.784	8.446	92.362	<0.000 1

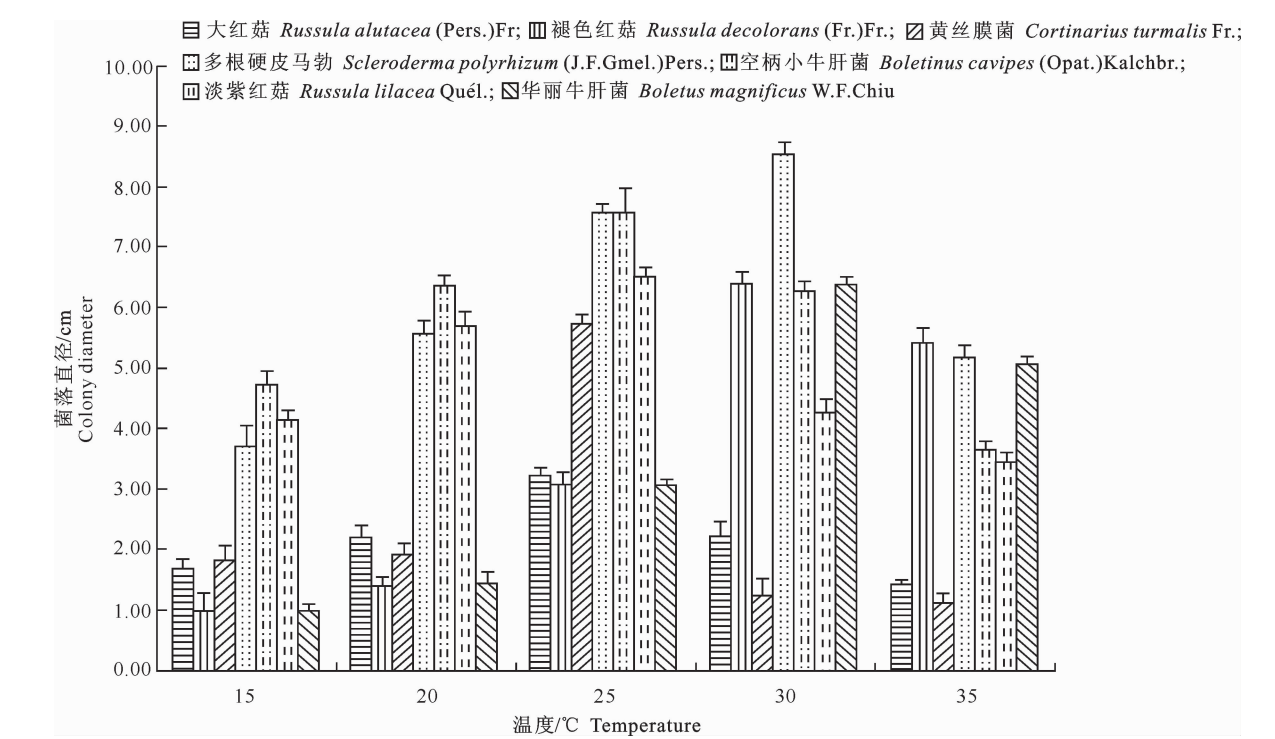


图 1 温度对 7 种板栗外生菌根真菌生长状况的影响

Fig. 1 Effects of different temperatures on culturing of ectomycorrhizal fungi

2.2.2 pH 值 采用单因素方差分析的方法,分析 径,结果(表 4)显示, pH 值对所有菌根真菌的生长同一种外生菌根真菌在不同 pH 值条件下的菌落直 都有极显著($P<0.01$)影响。

表 4 pH 值对 7 种板栗外生菌根真菌生长影响的单因素方差分析

Table 4 One-way ANOVA for effects of different pH values on culturing of ectomycorrhizal fungi

菌根真菌 Ectomycorrhiza	df	离均差平方和 ANOVA SS	均方 Mean square	F 检验值 F value	Pr>F
大红菇 <i>Russula alutacea</i> (Pers.)Fr	4	11.199	2.800	78.671	<0.000 1
褪色红菇 <i>Russula decolorans</i> (Fr.)Fr.	4	20.669	5.167	78.772	<0.000 1
黄丝膜菌 <i>Cortinarius turmalis</i> Fr.	4	44.032	11.008	351.332	<0.000 1
多根硬皮马勃 <i>Scleroderma polyrhizum</i> (J. F. Gmel.)Pers.	4	113.696	28.424	365.213	<0.000 1
空柄小牛肝菌 <i>Boletinus cavipes</i> (Opat.)Kalchbr.	4	11.199	2.800	78.671	<0.000 1
淡紫红菇 <i>Russula lilacea</i> Quél.	4	27.439	6.860	241.223	<0.000 1
华丽牛肝菌 <i>Boletus magnificus</i> W. F. Chiu	4	33.855	8.464	216.864	<0.000 1

由图 2 可以看出,7 种板栗外生菌根真菌菌落直径都随着 pH 值的升高逐渐增加,达到最高值后,又随着 pH 值的升高开始减小。其中淡紫红菇最适 pH 值为 5.0,其余真菌最适 pH 值为 6.0。当培养环境为中性或碱性时,所有菌根真菌的生长速度减

慢。表明酸性环境适宜 7 种外生菌根真菌的生长,中性或碱性环境下长势不良,如淡紫红菇在 pH 值为 8.0 时生长缓慢,培养 12~14 d 后菌丝老化停止生长,而大红菇在 pH 值为 8.0 条件下培养 2~4 d 后已停止生长。

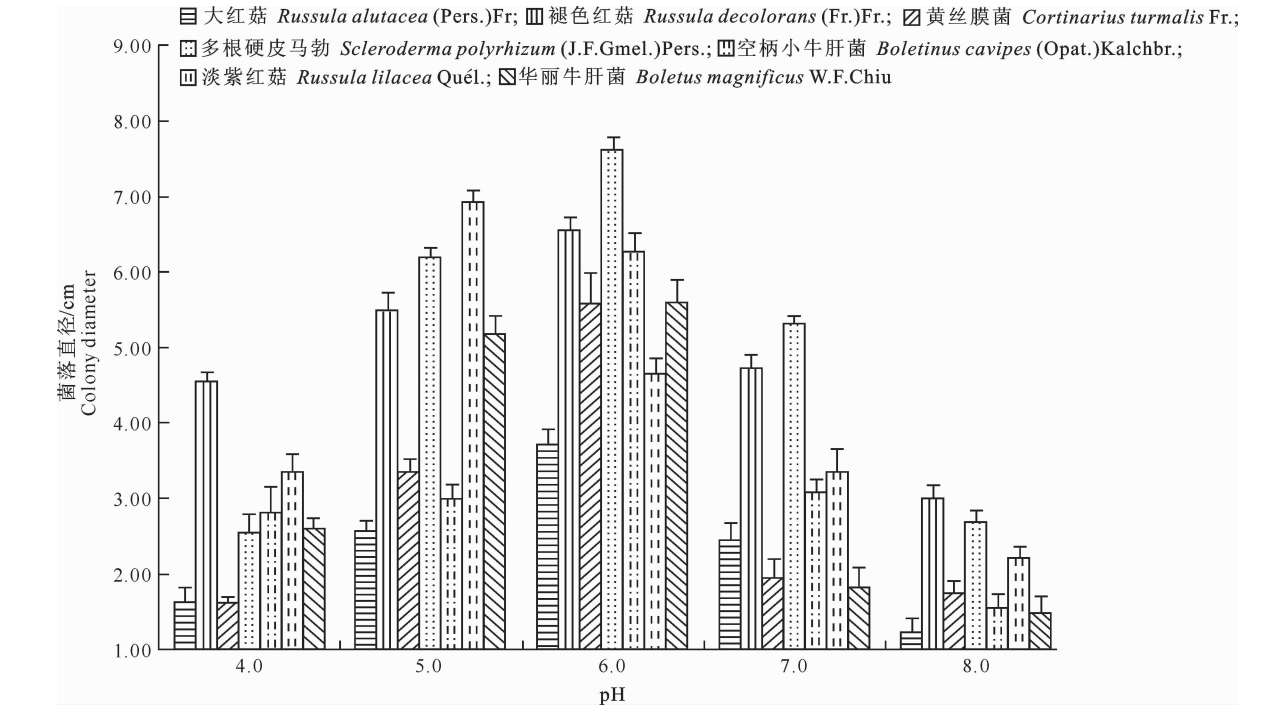


图 2 pH 值对 7 种板栗外生菌根真菌生长的影响

Fig. 2 Effects of different pH values on culturing of ectomycorrhizal fungi

2.2.3 碳 源 采用单因素方差分析的方法,分析同一种外生菌根真菌在不同碳源条件下的菌落直径,结果(表 5)显示,碳源因素对所有菌根真菌的生长都有极显著($P<0.01$)影响。不同碳源条件下 7 种板栗外生菌根真菌的菌落直径如表 6 所示。

表 5 碳源对 7 种板栗外生菌根真菌生长影响的单因素方差分析

Table 5 One-way ANOVA for effects of different carbon sources on culturing of ectomycorrhizal fungi

菌根真菌 Ectomycorrhiza	df	离均差平方和 ANOVA SS	均方 Mean square	F 检验值 F value	Pr>F
大红菇 <i>Russula alutacea</i> (Pers.)Fr	4	14.651	3.663	30.504	<0.000 1
褪色红菇 <i>Russula decolorans</i> (Fr.)Fr.	4	49.108	9.822	140.969	<0.000 1
黄丝膜菌 <i>Cortinarius turmalis</i> Fr.	4	14.527	3.632	86.076	<0.000 1
多根硬皮马勃 <i>Scleroderma polyrhizum</i> (J. F. Gmel.) Pers.	4	13.999	3.500	54.705	<0.000 1
空柄小牛肝菌 <i>Boletinus cavipes</i> (Opat.)Kalchbr.	4	17.311	4.333	76.022	<0.000 1
淡紫红菇 <i>Russula lilacea</i> Quél.	4	16.221	4.055	31.756	<0.000 1
华丽牛肝菌 <i>Boletus magnificus</i> W. F. Chiu	4	15.122	3.780	70.031	<0.000 1

表 6 不同碳源条件下 7 种板栗外生菌根真菌的菌落直径

Table 6 Average colony diameters of ectomycorrhizal fungi with different carbon sources

菌根真菌 Ectomycorrhiza	葡萄糖 Dextrose	可溶性淀粉 Soluble starch	蔗糖 Saccharose	麦芽糖 Maltose	甘露醇 Mannitol	对照(无糖) No sugar
大红菇 <i>Russula alutacea</i> (Pers.)Fr	3.388 b	5.583 a	3.065 b	4.953 a	3.483 b	0.683 c
褪色红菇 <i>Russula decolorans</i> (Fr.) Fr.	4.406 c	5.465 ab	5.595 a	4.996 b	4.517 c	0.723 d
黄丝膜菌 <i>Cortinarius turmalis</i> Fr.	4.019 d	5.038 c	3.940 d	5.986 b	6.343 a	0.668 e
多根硬皮马勃 <i>Scleroderma polyrhizum</i> (J. F. Gmel.) Pers.	5.565 b	5.165 b	4.398 c	7.295 a	5.160 b	0.702 d
空柄小牛肝菌 <i>Boletinus cavipes</i> (Opat.) Kalchbr.	6.591 a	4.403 b	3.588 c	3.756 c	4.366 b	0.803 e
淡紫红菇 <i>Russula lilacea</i> Quél.	8.070 a	5.175 c	5.795 b	5.828 b	5.382 bc	0.670 d
华丽牛肝菌 <i>Boletus magnificus</i> W. F. Chiu	6.248 a	4.625 b	3.717 cd	3.408 d	4.048 c	1.475 e

注:同行数据后标不同小写字母者表示差异显著($P<0.05$)。表 8 同。

Note: Different small letters in each row indicate significant difference ($P<0.05$). The same for Table 8.

由表 6 可以看出,多数真菌可吸收利用的碳源范围较广,但不同菌种对碳源的利用情况不同,相比

而言,真菌对单糖的吸收效果总体上好于多糖。褪色红菇在以蔗糖为碳源的培养基内生长速度最快,表明其最适碳源为蔗糖;空柄小牛肝菌、淡紫红菇和华丽牛肝菌在以葡萄糖为碳源的培养基内生长速度最快,它们的最适碳源为葡萄糖;同理,黄丝膜菌的最适碳源为甘露醇,多根硬皮马勃的最适碳源为麦

芽糖,大红菇的最适碳源为可溶性淀粉。
2.2.4 氮 源 采用单因素方差分析的方法,分析同一种外生菌根真菌在不同氮源条件下的菌落直径,结果(表 7)显示,氮源因素对所有菌根真菌的生长都有极显著($P<0.01$)影响。

表 7 氮源对外生菌根真菌生长影响的单因素方差分析

菌根真菌 Ectomycorrhiza		df	离均差平方和 ANOVA SS	均方 Mean square	F 检验值 F value	Pr>F
大红菇	<i>Russula alutacea</i> (Pers.)Fr	3	93.633	31.211	311.314	<0.000 1
褪色红菇	<i>Russula decolorans</i> (Fr.) Fr.	3	82.974	20.743	359.630	<0.000 1
黄丝膜菌	<i>Cortinarius turmalis</i> Fr.	3	27.533	9.178	84.967	<0.000 1
多根硬皮马勃	<i>Scleroderma polyrhizum</i> (J. F. Gmel.)Pers.	3	32.502	10.834	148.154	<0.000 1
空柄小牛肝菌	<i>Boletinus cavipes</i> (Opat.)Kalchbr.	3	44.019	14.673	209.184	<0.000 1
淡紫红菇	<i>Russula lilacea</i> Quél.	3	51.991	17.330	193.916	<0.000 1
华丽牛肝菌	<i>Boletus magnificus</i> W. F. Chiu	3	33.405	11.135	139.097	<0.000 1

由表 8 可以看出,多种氮源均能被 7 种菌根真菌利用,与硝态氮氮源相比,大部分菌根真菌在有机氮和铵态氮氮源条件下菌落直径较大。大红菇和空柄小牛肝菌在以酵母浸出液为氮源的培养基内生长速度最快,表明它们的最适氮源为酵母浸出液;同理,多根硬皮马勃的最适氮源为蛋白胨;褪色红菇、

淡紫红菇和华丽牛肝菌的最适氮源为 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_3$;黄丝膜菌的最适氮源为 KNO_3 。此外,多根硬皮马勃、淡紫红菇和空柄小牛肝菌在有机氮(蛋白、酵母)和铵态氮 $((\text{NH}_4)_2\text{HPO}_3)$ 为氮源的培养基内生长迅速。

表 8 不同氮源条件下 7 种板栗外生菌根真菌的菌落直径

菌根真菌 Ectomycorrhiza		蛋白胨 Peptone	KNO_3	$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_3$	酵母浸出液 Yeast extract	对照(无氮) No nitrogen
大红菇	<i>Russula alutacea</i> (Pers.)Fr	7.588 b	1.862 d	3.563 c	8.645 a	1.048 e
褪色红菇	<i>Russula decolorans</i> (Fr.) Fr.	4.406 c	5.465 ab	5.595 a	4.996 b	4.517 c
黄丝膜菌	<i>Cortinarius turmalis</i> Fr.	6.603 c	8.435 a	4.317 d	7.392 b	0.823 e
多根硬皮马勃	<i>Scleroderma polyrhizum</i> (J. F. Gmel.) Pers.	8.842 a	4.688 c	7.088 b	8.562 a	0.650 d
空柄小牛肝菌	<i>Boletinus cavipes</i> (Opat.) Kalchbr.	7.583 b	3.530 d	6.347 c	8.658 a	0.650 e
淡紫红菇	<i>Russula lilacea</i> Quél.	8.600 a	3.613 c	8.720 a	7.655 b	0.772 d
华丽牛肝菌	<i>Boletus magnificus</i> W. F. Chiu	3.813 b	1.840 c	6.525 a	3.755 b	1.010 d

3 讨 论

温度是影响外生菌根真菌生长和发育的主要环境因子。本研究中,7 种菌根真菌中有 5 种最适温度为 25 ℃,可见此温度是大部分菌根真菌的最适温度,这一结论在姚庆智等^[11]的研究中得到了证实,他认为,22.5~25 ℃是大多数菌根真菌的最适生长温度;但是本研究中还有 3 种菌根真菌的最适温度为 30 ℃,在 35 ℃时依然可以生长。李翠等^[9]和毕国昌等^[12]在研究中同样发现了类似的耐高温菌根真菌,可见不同菌根真菌的最适温度存在差异。本研究筛选出每一种菌根真菌的最适温度,是进行其他研究的基础与前提,只有在最适温度下研究其他因子对菌根真菌生长的影响,所得结果才更加准确;在采集过程中,笔者发现,最适温度为 25 ℃的真菌

子实体主要分布在湿度大和光线弱的环境,而耐高温真菌的子实体分布范围较广。

pH 值同样也是影响外生菌根真菌生长和发育的主要环境因子。本研究中,淡紫红菇的最适 pH 值为 5.0,其他 6 种菌根真菌的最适 pH 值为 6.0,表明 7 种菌根真菌最适生长环境均为酸性,同样,在 Xu 等^[13]对樟子松外生菌根真菌培养条件筛选的研究也得到了相同的结果。蒋盛岩等^[14]的研究也证实,菌根真菌适于在偏酸性的环境中培养,所以在实际生产中应当将板栗种植在偏酸性的土壤中,由于菌根真菌的大量存在,可增加其根系被外生菌根真菌侵染的几率,使板栗植株长势良好、抗性提高。如果土壤为碱性,应通过物理、水利或化学方法改良^[15]后再种植板栗。

碳源是真菌生长的主要能量来源,其对真菌的

生长十分重要,本研究中,7种外生菌根真菌均对碳源的利用范围较广,但每种菌根真菌的最适碳源不尽相同,这一结果得到了李翠等^[9]研究的证实,她认为,麦芽糖、甘露醇、可溶性淀粉和葡萄糖分别为4种不同外生菌根真菌的最适碳源。本研究中,单糖和多糖均能被多数菌根真菌很好地利用,相比较而言单糖的利用效果更好;宝秋利等^[16]在研究土生空团菌菌丝的最适培养条件时,发现该菌在供试的碳源中,对葡萄糖和蔗糖的利用优于其他多糖碳源,此结论与本研究结论相符;而本研究表明,在无糖条件下,7种真菌的生长均受到极大的影响。

氮源作为真菌生长中重要的营养来源,同样对真菌的生长十分重要,本研究结果表明,7种板栗外生菌根真菌的最适氮源存在较大差异,这一结论在蔡敏等^[17]的研究中得到了证实,她发现不同的菌根真菌菌株有的适用硝态氮,有的适用铵态氮;本研究中,7种菌根真菌能够利用多种氮源,其中有机氮源和铵态氮源的利用效果普遍比无机氮源好;许多学者的研究都得出了类似的结论,如宋微等^[18]在对林木外生菌根真菌生物学特性的研究中发现,在以 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_3$ 、酵母浸出液和蛋白胨作为氮源的培养基内,多种外生菌根真菌可迅速生长,效果好于硝态氮氮源;李翠等^[9]的研究也得出了类似的结论。而在无氮条件下,本试验中7种真菌的生长均受到极大的影响。

外生菌根真菌纯培养的最适条件研究结果对日后推广、应用具有非常重要的意义,宋微等^[19]利用纯培养的菌根真菌结果,进一步制作成菌剂并在苗木研究中应用;本试验得出的7种板栗外生真菌最佳纯培养条件,为将其应用于菌根机理的探索性研究和板栗菌剂产品的开发奠定了重要基础,同时也为提高山区板栗林抗旱能力提供了新思路。此外,自然界的的环境较为复杂,需要综合考虑除本研究设定的4种因素以外的更多的实际因素,这样才能更好地开发利用这些菌根真菌资源。

4 结 论

本研究初步确定了7种外生菌根真菌的最适纯培养条件,其中大红菇的最适温度为25℃,pH值为6.0,碳源为可溶性淀粉,氮源为酵母浸出液;褪色红菇的最适温度为30℃,pH值为6.0,碳源为蔗糖,氮源为 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_3$;黄丝膜菌的最适温度为25℃,pH值为6.0,碳源为甘露醇,氮源为 KNO_3 ;多根硬皮马勃的最适温度为30℃,pH值为6.0,碳

源为麦芽糖,氮源为蛋白胨;空柄小牛肝菌的最适温度为25℃,pH值为6.0,碳源为葡萄糖,氮源为酵母浸出液;淡紫红菇的最适温度为25℃,pH值为5.0,碳源为葡萄糖,氮源为 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_3$;华丽牛肝菌的最适温度为30℃,pH值为6.0,碳源为葡萄糖,氮源为 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_3$ 。不同外生菌根真菌的最适纯培养条件存在差异,温度、pH值、碳源和氮源对所有菌根真菌生长的影响都极显著。

[参考文献]

- [1] 郗荣廷. 果树栽培学分论 [M]. 北京:中国农业出版社,1997.
Xi R T. Fruit cultivation theory of credit [M]. Beijing: China Agriculture Press,1997. (in Chinese)
- [2] 秦 岭,徐 践,马 萱,等. 板栗共生菌根真菌种类及其发生规律的研究 [J]. 北京农学院学报,1995,10(1):71-75.
Qin L,Xu J,Ma X,et al. Research on symbiotical fungi species and ectomycorrhizae occurrence of chestnut (*Castanea mollissima* Bl.) [J]. Journal of Beijing Agricultural College,1995,10(1):71-75. (in Chinese)
- [3] Pereira E,Coelho V,Tavares R M,et al. Effect of competitive interactions between ectomycorrhizal and saprotrophic fungi on *Castanea sativa* performance [J]. Mycorrhiza,2012,22(1):41-49.
- [4] Martins A,Marques G,Borges O,et al. Management of chestnut plantations for a multifunctional land use under mediterranean conditions: Effects on productivity and sustainability [J]. Agroforest Syst,2011,81:175-189.
- [5] Vizzini A,Carbone M,Boccardo F. Molecular validation of *Sarcodon quercinofibulatus*, a species of the *S. imbricatus* complex associated with Fagaceae, and notes on *Sarcodon* [J]. Mycol Progress,2012. DOI:10.1007/s11557-012-0851-9.
- [6] Palmer J M,Lindner D L,Volk T J. Ectomycorrhizal characterization of an American chestnut (*Castanea dentata*)-dominated community in Western Wisconsin [J]. Mycorrhiza,2008,19(1):7-36.
- [7] 秦 岭,王有智. 板栗菌根真菌及其分离培养 [C]//园艺学进展(第2辑). 南京:东南大学出版社,1998:218-222.
Qin L,Wang Y Z. Ectomycorrhizal fungi of chestnut and their culture [C]//Advances in Horticulture(Ⅱ). Nanjing: South-east University Press,1998:218-222. (in Chinese)
- [8] 于富强,纪大千,刘培贵. 云南外生菌根真菌分离培养研究 [J]. 植物研究,2003,23(1):66-71.
Yu F Q, Ji D G, Liu P G. Studies on pure culture of the ectomycorrhizal fungi associated with *Pinus Yunnanensis* [J]. Bulletin of Botanical Research,2003,23(1):66-71. (in Chinese)
- [9] 李 翠,杨 艳,张茹琴,等. 4种外生菌根真菌培养条件的研究 [J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版,2009,37(2):155-159.
Li C, Yang Y, Zhang R Q, et al. Cultivating conditions on the growth of 4 ectomycorrhizal fungi *in vitro* [J]. Journal of

- Northwest A&F University; Nat Sci Ed, 2009, 37(2): 155-159. (in Chinese)
- [10] Takeshi T, Ryota K, Kazuyolii F. Plant growth and nutrition in pine (*Pinus thunbergii*) seedlings and dehydrogenase and phosphatase activity of ectomycorrhizal root tips inoculated with seven individual ectomycorrhizal fungal species at high and low nitrogen conalitions [J]. Soil Biology & Biochemistry, 2008, 40(5): 1235-1243.
- [11] 姚庆智, 闫伟. 11 株外生菌根真菌菌株纯培养营养生理特性的研究 [J]. 内蒙古大学学报: 自然科学版, 2005, 36(2): 186-191.
- Yao Q Z, Yan W. Study on physiological characteristics of 11 ectomycorrhizal strains on pure cultural condition [J]. Journal of Inner Mongolia University; Natural Science Edition, 2005, 36(2): 186-191. (in Chinese)
- [12] 毕国昌, 郭秀珍, 臧穆. 在纯培养条件下温度对外生菌根真菌生长的影响 [J]. 林业科学研究, 1989, 2(3): 247-253.
- Bi G C, Guo X Z, Zang M. Influence of temperature on colony growth of ectomycorrhizal fungi in pure culture [J]. Forest Research, 1989, 2(3): 247-253. (in Chinese)
- [13] Xu M L, Zhu J J, Kang H Z, et al. Optimum conditions for pure culture of major ectomycorrhizal fungi obtained from *Pinus sylvestris* var. *mongolica* plantations in southeastern Keerqin sandy lands China [J]. Journal of Forestry Research, 2008, 19(2): 113-118.
- [14] 蒋盛岩, 张平, 胡劲松, 等. 外生菌根菌白毒伞 (*Amanita verna*) 菌丝体纯培养条件 [J]. 湖南师范大学自然科学学报, 2002, 25(1): 75-77.
- Jiang S Y, Zhang P, Hu J S, et al. Study on pure culture of ectomycorrhizal fungi *Amanita verna* [J]. Jour Nat Scie Hunan Norm Uni, 2002, 25(1): 75-77. (in Chinese)
- [15] 陈少华, 何胜. 浅谈园林酸碱性土壤改良方法 [J]. 热带林业, 2008, 36(4): 10-11.
- Chen S H, He S. Talking on improvement method of garden soil [J]. Tropical Forestry, 2008, 36(4): 10-11. (in Chinese)
- [16] 宝秋利, 闫伟, 梁显丽. 土生空团菌 (*Cenococcum geophilum* Fr.) 菌丝体纯培养条件的初步研究 [J]. 内蒙古农业大学学报: 自然科学版, 2005, 26(1): 33-36.
- Bao Q L, Yan W, Liang X L. A preliminary study on the mycelia pure culture conditions of *Cenococcum geophilum* Fr. [J]. Journal of Inner Mongolia Agricultural University; Nat Sci Ed, 2005, 26(1): 33-36. (in Chinese)
- [17] 蔡敏, 谢莉, 黄建国. 氮源对外生菌根真菌生长及其氮磷钾含量的影响 [J]. 贵州农业科学, 2010, 38(2): 104-105.
- Cai M, Xie L, Huang J G. Effects of different nitrogen sources on growth and content of N, P, K in ectomycorrhizal fungi [J]. Guizhou Agricultural Sciences, 2010, 38(2): 104-105. (in Chinese)
- [18] 宋微, 吴小芹. 12 种林木外生菌根真菌的培养条件 [J]. 南京林业大学学报: 自然科学版, 2007, 31(3): 133-135.
- Song W, Wu X Q. Research of cultivating conditions of 12 wood ectomycorrhizal fungi [J]. Journal of Nanjing Forestry University; Natural Sciences Edition, 2007, 31(3): 133-135. (in Chinese)
- [19] 宋微, 吴小芹, 叶建仁. 江苏几种杨树优良外生菌根真菌的筛选 [J]. 南京林业大学学报: 自然科学版, 2009, 33(2): 81-84.
- Song W, Wu X Q, Ye J R. Screening elite ectomycorrhizal fungi for poplars in Jiangsu [J]. Journal of Nanjing Forestry University; Natural Science Edition, 2009, 33(2): 81-84. (in Chinese)

(上接第 108 页)

- [11] Chirumbolo, Salvatore. The role of quercetin, flavonols and flavones in modulating inflammatory cell function [J]. Inflammation, 2010, 9(4): 263-285.
- [12] Wang L, Tu Y C, Lian T W, et al. Distinctive antioxidant and antiinflammatory effects of flavonols [J]. J Agric Food Chem, 2006, 54(26): 9798-9804.
- [13] Ackland M L, Waarsenburg S, Rod J. Synergistic antiproliferative action of the flavonols quercetin and kaempferol in cultured human cancer cell lines [J]. In Vivo, 2005, 19: 69-76.
- [14] Xing N Z, Chen Y, Mitchell S H, et al. Quercetin inhibits the expression and function of the androgen receptor in LNCaP prostate cancer cells [J]. Carcinogenesis, 2001, 22(3): 409-414.
- [15] Francisco P V, Duarte J. Flavonols and cardiovascular disease [J]. Molecular Aspects of Medicine, 2010, 31(6): 478-494.
- [16] Yap S W, Qin C X, Owen L W. Effects of resveratrol and flavonols on cardiovascular function: Physiological mechanisms [J]. BioFactors, 2010, 36(5): 350-359.
- [17] 张康健, 杜仲 [M]. 北京: 中国林业出版社, 1990: 3-4.
- Zhang K J. *Eucommia ulmoides* Oliver [M]. Beijing: China Forestry Press, 1990: 3-4. (in Chinese)
- [18] Singh G. 植物系统分类学: 综合理论及方法 [M]. 刘全儒, 郭延平, 于明, 译. 北京: 化学工业出版社, 2008: 227-237.
- Singh G. Plant systematics: An integrated approach [M]. Liu Q R, Guo Y P, Yu M, translation. Beijing: Chemical Industry Press, 2008: 227-237. (in Chinese)
- [19] 燕丽萍, 夏阳, 梁惠敏, 等. 转 BADH 基因苜蓿 T1 代遗传稳定性和抗盐性研究 [J]. 草业学报, 2009, 18(6): 65-71.
- Yan L P, Xia Y, Liang H M, et al. A study on salt tolerance and the genetic stability of T1 generation transgenic alfalfa with the BADH gene [J]. Acta Prataculturae Sinica, 2009, 18(6): 65-71. (in Chinese)
- [20] 赵宇玮, 王英娟, 步怀宇, 等. AtNHX1 基因对菊苣的转化和耐盐性研究 [J]. 草业学报, 2009, 18(3): 103-109.
- Zhao Y W, Wang Y J, Bu H Y, et al. Transformation of *Cichorium intybus* with the AtNHX1 gene and salinity tolerance of the transformants [J]. Acta Prataculturae Sinica, 2009, 18(3): 103-109. (in Chinese)